

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-009971

(43)Date of publication of application : 16.01.1996

(51)Int.Cl.

C12N 7/00

C12N 15/09

(21)Application number : 06-186886

(71)Applicant : TAKADA KENZO

(22)Date of filing : 05.07.1994

(72)Inventor : TAKADA KENZO  
YOSHIYAMA HIRONORI  
SHIMIZU NORIO

## (54) METHOD FOR SEPARATORY PROLIFERATION OF RECOMBINANT EB VIRUS

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To separate and proliferate a recombinant EB virus capable of being used for the gene therapy of congenital disorders in metabolism or cancer as a vaccine for the immunity induction against pathogens.

**CONSTITUTION:** An extraneous gene containing a selective marker is transduced into an EB virus plasmid held by an Akata cell by homologous recombination. Subsequently, of the cell clones in which the homologous recombination has occurred, such a cell clone as to have been completely freed from wild-type virus plasmid and contain the recombinant plasmid alone is sorted. The objective recombinant EB virus can be mass-produced by anti-human immunoglobulin antibody treatment of this cell clone.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-9971

(43)公開日 平成8年(1996)1月16日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 7/00 15/09		8931-4B  9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数2 書面 (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平6-186886

(22)出願日 平成6年(1994)7月5日

(71)出願人 594134213

高田 賢蔵

山口県宇部市北琴芝一丁目2番11-302号

(72)発明者 高田 賢蔵

山口県宇部市北琴芝一丁目2番11-302号

(番地なし)

(72)発明者 吉山 裕規

山口県宇部市大字上宇部川添一丁目4番33

-305号 (番地なし)

(72)発明者 清水 則夫

山口県宇部市大字沖宇部2557番地

(54)【発明の名称】 組換えEBウイルスの分離増殖法

(57)【要約】

【目的】 組換えEBウイルスの分離増殖。

【構成】 A k a t a細胞が保持するEBウイルスプラスミドへ相同組換えにより選択マーカを含む外来遺伝子を導入する。相同組換えが起こった細胞クローンの内、野生型ウイルスプラスミドが完全に脱落し、組換えプラスミドのみを含む細胞クローンを選別する。細胞を抗ヒトイムノグロブリン抗体処理することにより、組換えEBウイルスを大量に産生させることができる。

【効果】 組換えEBウイルスを大量に分離増殖できる。従って、各種外来遺伝子を挿入した組換えEBウイルスを分離増殖できる。分離増殖された組換えEBウイルスは、病原体への免疫誘導のためのワクチンとして、及び、先天性代謝異常症、癌などに対する遺伝子治療に使用できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生命研菌寄第14405号であるAkata細胞株を使用することを特徴とする組換えEBウイルスの分離増殖法。

【請求項2】 請求項1の方法により分離増殖した組換えEBウイルス。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、従来分離増殖が困難であった組換えエプスタインバー（Epstein-Barr）ウイルス（以下、EBウイルスと略す）を効率的に分離増殖させることができ、遺伝子治療のための組換えEBウイルス及び組換えEBウイルスワクチン作製に利用できる細胞株、これを用いた組換えEBウイルスの分離増殖法及びこの方法を用いて分離増殖した組換えEBウイルスに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 EBウイルスはBリンパ球に感染し、細胞をトランスフォームさせる。しかし、一般的にEBウイルスは、細胞に持続的に潜伏感染するのみで、感染した細胞は成熟したウイルスをほとんど産生しない。従って、EBウイルス源として、3種類のEBウイルストランスフォーム細胞、B95-8、P3HR-1、Akataが用いられてきた。その理由は、この3つ以外の細胞がほとんどウイルスを産生しないからである（Fields, B. N. and D. M. Knipe (ed.), 1990 Virology, 2nd ed., Raven Press, New York: Chapter 67, Epstein-Barr Virus and Its Replication, E. Kieff and D. Liebowitz, p1889-1920.）。これらのEBウイルス産生細胞は、複数コピーのウイルスDNAをプラスミドとして細胞内に保持している。相同組換えにより、細胞内のウイルスプラスミドへ外来DNAを導入し、組換えEBウイルスを作製することが、試みられている（wang, F., Marchini, A. and Kieff, E., J. Virol. 65, 1701-1709 (1991)）。しかし、組換えが起こっているのは、これらの細胞が保持する複数コピーのウイルスプラスミドの内の1ヶのみで、産生されるのは組換えウイルスと非組換えウイルスの混合物に過ぎない。組換えウイルスのみを増やすことは不可能であった。さらに、これらの組換えウイルスと非組換えウイルスの混合液をEBウイルス未感染Bリンパ球細胞株（BL30、Loukes等）へ感染させることにより、組換えEBウイルスのみが感染した細胞を分離し、組換えウイルスのみを増殖させることが試みられている（Marchini, A., Longnecker, R. and Kieff, E., J. Virol. 66, 4972-4981 (1992)）。そして、それらの細胞でのウイルス産生を誘導するために、細胞へ電気穿孔法によりEBウイルス産生誘導遺伝子BZLF1を導入し、同時に、腫瘍プロモーターTPAを添加する処理を行っている。しかし、組換えEBウイルスを治療目的でヒトに接種することを考えると、腫瘍プロモーターを用いることは安全上問題がある。また、電気穿孔法により、ヒトに使用するための大量、均質なウイルス標品を調整するのは困難と考えられる。さらに、われわれの追試の実験では、BL30、Loukes等のBリンパ球細胞株ではウイルス産生を誘導できなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 EBウイルス感染細胞にはEBウイルスDNAがプラスミドとして存在する。細胞内のEBウイルスプラスミドは非常に安定で、細胞が分裂増殖しても脱落せず確実に維持されることが知られている。EBウイルス感染細胞の内、Akata細胞は抗ヒトイムノグロブリン抗体処理によりEBウイルスを大量に産生するユニークな性状を有している（Takada, K., Int. J. cancer, 33, 27-32 (1984) および Takada, K. and Ono, Y., J. Virol. 63, 445-449 (1989)）。しかし、Akata細胞には約20コピーのEBウイルスDNAがプラスミドとして維持されており、相同組換えによりEBウイルスプラスミドへ外来遺伝子を挿入しても、これらの細胞が産生するのは組換えウイルスと野生型ウイルスの混合物に過ぎない。Akata細胞を使用して組換えEBウイルスのみを分離増殖したとの報告はない。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 最近、我々は、Akata細胞の培養を続ける内に、一部の細胞からEBウイルスプラスミドが脱落していくことを見いだした（第41回日本ウイルス学会総会にて発表）。このような性状は、Akata細胞のみが保持するユニークなものである。そこで、Akata細胞が保持する約20コピーのEBウイルスプラスミドを標的として、相同組換えにより薬剤耐性遺伝子を導入し、薬剤選択によりEBウイルスプラスミドの標的部位が薬剤耐性遺伝子で置換した細胞クローンを多数分離した。一般的にこれらの細胞クローンは、組換えの起こったウイルスプラスミドと組換えの起こっていないウイルスプラスミドの両方を含んでおり、細胞が保持するすべてのウイルスプラスミドに薬剤耐性遺伝子を導入することはできなかった。しかし、組換えEBウイルスプラスミドを含むAkata細胞クローン多数について調べたところ、ごく一部のクローンが組換えプラスミドのみを含んでおり、抗ヒトイムノグロブリン抗体処理により組換えEBウイルスを大量に産生した。薬剤存在下で培養を続ける内に、組換えの起こらなかったプラスミドは脱落し、組換えの起こったプラス

ミドのみを含むAkata細胞クローンが分離できること、従って、Akata細胞を用いることにより組換えEBウイルスを大量に分離増殖できることを見だし、本発明を完成させるに至った。

【0005】即ち本発明は、組換えEBウイルス分離増殖能を有するAkata細胞株、この細胞株を使用することを特徴とする組換えEBウイルスの分離増殖法及びこの方法により分離増殖されたEBウイルスに関する。

【0006】Akata細胞は、各種濃度のウシ胎児血清を含む培養液中で培養できるが、10%ウシ胎児血清を含む培養液が推奨される。また、血清を含まないような無血清培地中でも培養できる。各種アミノ酸、糖類等を含むような培養液においても培養できる。3日～4日おきに $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$  / mlの細胞密度で新しい培養液に分散し、33°C～40°Cの温度で培養できる。培養温度は、37°Cが推奨される。

【0007】上記方法により組換えウイルスを作製するために外来DNAを挿入できるEBウイルスプラスミドDNAの部位としては、BamHI-X断片領域(EBウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子部分)、BamHI-W1断片領域等、EBウイルスの感染性に影響の無い部位が使用できる。後述する実施例においてはBamHI-X断片領域、BamHI-W1断片領域を用いた。

【0008】上記方法による組換えEBウイルスプラスミドを含む細胞の選択のために、相同組換え用プラスミドへ挿入する選択マーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、XGPR T (Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase) 遺伝子等が使用できる。後述する実施例においてはネオマイシン抵抗性遺伝子を用いている。

【0009】上記方法によりEBウイルスプラスミドへ、選択マーカー遺伝子と同時に各種ヒト、動植物、微生物遺伝子が導入できる。後述する実施例においては、単純ヘルペスウイルス1型のTK遺伝子を導入した。

【0010】上記方法により分離した組換えプラスミドを含むAkata細胞にウイルス産生を誘導するためには、抗ヒトイムノグロブリン抗体、BZLF1遺伝子DNA、TPA、n-酪酸、カルシウムイオノフォア、Cキナーゼ誘導剤、低温培養等の処理が使用できる。後述する実施例においては抗ヒトイムノグロブリン抗体を使用した。

【0011】前記処理後、組換えEBウイルスプラスミドを含む細胞の一次スクリーニング法としては、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、サザンブロット法等が使用できる。後述する実施例においてはPCR法又はサザンブロット法を用いている。

【0012】本発明に使用する組換えEBウイルス分離増殖能を有するAkata細胞を1994年7月1日に

工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号第14405号(FERM P-14405)として寄託した。

この細胞株はヒトリンパ球癌細胞由来で、染色体は2倍体の細胞である。形態は球状の浮遊形である。この細胞株は液体窒素中で長期保存が可能である。

【0013】本発明による組換えEBウイルスの分離増殖は、まず、Akata細胞が保持するEBウイルスプラスミドへ相同組換えにより選択マーカーを含む外来遺伝子を導入する。相同組換えが起こった細胞クローンの内、野生型ウイルスプラスミドが完全に脱離し、組換えプラスミドのみを含む細胞クローンを選別する。細胞を抗ヒトイムノグロブリン抗体処理することにより、組換えEBウイルスを大量に産生させることができる。このようにして得られるEBウイルスは各種用途に使用できる。

【0014】

【実施例】

実施例1

まず、組換え用プラスミドを構築した。プラスミドベクターpBSへEBウイルスのTK遺伝子(BamHI-X断片領域)を含む4.3キロ塩基対を組み込み、次いで、制限酵素AflII切断によりTK遺伝子部分から1.7キロ塩基対を除いた部分へネオマイシン抵抗性遺伝子(SV40プロモーター制御下、1.9キロ塩基対)を組み込んだ。次いで、Akata細胞 $10^7$ 当たり組換え用プラスミドプラスミド80 $\mu$ gを電気穿孔法により導入した。2日後に5,000細胞/200 $\mu$ l/ウェルで96穴プレートにまきこみ、ネオマイシン700 $\mu$ g/ml存在下で培養した。約3週間後に約50%のウェルに細胞増殖を認めた。128ヶのネオマイシン耐性細胞クローンそれぞれからDNAを抽出し、PCR法(予想される組換え部位のEBウイルス部分とネオマイシン耐性遺伝子部分にプライマーを設定)により、TK遺伝子部分で組換えが起こっているか否か調べた。その結果、120クローンで相同組換えが起こっていた。さらに、組換えが起こっていないプラスミドの有無をPCR法で調べたところ、2クローンが相同組換えが起こったプラスミドのみを含んでいた。組換えプラスミドのみを含む2つの細胞クローンを抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理し、EBウイルス産生を誘導した。次いで、EBウイルス産生の指標となるEBウイルスキャプシド抗原(VCA)の発現を、VCAに対する単クローン抗体C1-51を用いて蛍光抗体法により調べた。その結果、両細胞クローン共に約50%の細胞がVCAを産生していた。さらに、産生された組換えEBウイルスを精製し、ウイルスDNA量を測定した。両細胞クローン共、培養1リットル当たり約10 $\mu$ gのウイルスDNAが回収された。この量は、代表的なEBウイルス産生細胞株B95-8、P3HR-1が産生するウイルス量に匹敵する。このことにより、Akata細胞を使用し

て、組換えウイルスを大量に分離増殖できることが明らかとなった。

#### 【0015】実施例2

まず、組換え用プラスミドを構築した。プラスミドベクタ pPUC19へEBウイルスのBamHI-W1断片2.5キロ塩基対を組み込み、次いで、制限酵素XhoI切断した部分ヘネオマイシン抵抗性遺伝子(SV40プロモーター制御下、1.9キロ塩基対)を組み込んだ。次いで、実施例1と同様の方法により、組換え用プラスミドをAkata細胞へ導入し、ネオマイシン抵抗性の細胞クローン150ヶを分離した。サザンブロット法により、BamHI-W1部分ヘネオマイシン抵抗性遺伝子が組み込まれているか否かを調べた。その結果、143クローンで相同組換えが起こっていた。これら143クローン中4クローンは相同組換えが起こったプラスミドのみを含んでいた。相同組換えが起こったプラスミドのみを含む4クローンを抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理し、EBウイルス産生を誘導した。4クローン中3クローンで約40～50%の細胞がVCA陽性で、ウイルス産生を行っていることが確認された。

#### 【0016】実施例3

まず、組換え用プラスミドを構築した。実施例1で作製した組換え用プラスミドを制限酵素BglIIで切断し、ヒト単純ヘルペスウイルス1型のTK遺伝子を含む3.5キロ塩基対のDNAを組み込んだ。実施例1と同様の方法により、作製したプラスミドをAkata細胞

へ導入し、相同組換えが起こったEBウイルスプラスミドを含む細胞クローンを分離した。調べた50クローンの内、1クローンが組換えが起こったプラスミドのみを含んでいた。この細胞クローンを抗ヒトイムノグロブリン抗体で処理すると、約40%の細胞がVCA陽性となり、ウイルス産生が起こっていることが確認された。組換えEBウイルスプラスミドを含む細胞クローンと含まないAkata細胞を、ガンシクロピア存在下で培養したところ、組換えEBウイルスが感染しているAkata細胞は死滅したが、感染していないAkata細胞はガンシクロピアを加えない場合と同様に増殖した。これは、組換えEBウイルスが感染しているAkata細胞では、EBウイルスプラスミドに組み込んだ単純ヘルペスウイルスのTK遺伝子が発現し、そのために細胞がガンシクロピア感受性になったことを示している。以上の結果、EBウイルスプラスミドへ外来遺伝子を組み込んだAkata細胞では、外来遺伝子産物が産生されることが明かとなった。

#### 【0017】

【発明の効果】本発明の結果、Akata細胞株を使用することにより、組換えEBウイルスを大量に分離増殖できる。従って、各種外来遺伝子を挿入した組換えEBウイルスを分離増殖できる。分離増殖された組換えEBウイルスは、病原体への免疫誘導のためのワクチンとして、及び、先天性代謝異常症、癌などに対する遺伝子治療に使用できる。